บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1. การเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus subtilis*

3.1.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ

Pancreatic digest of casien	10.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Na2HPO4	2.5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.4

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันก่อนที่จะนำไปปรับ pH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แบ่งใส่หลอดขนาด 13x100 มิลลิเมตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 3 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเมื่อยังไม่นำมาใช้

3.1.2 การเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก stock แล้ว stab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จากข้อ 3.1.1. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เท paraffin oil ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบนผิวหน้า เก็บไว้ที่ 4^{o}ซ เก็บได้นาน ประมาณ 1 เดือน

3.2. การทำเชื้อตั้งต้น (start inoculum)

3.2.1. อาหารที่ใช้เตรียม inoculum 1 ประกอบด้วย:

$NaNH_4HPO_4.4H_2O$	3.5	กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	7.5	กรัม
KH_2PO_4	3.7	กรัม
MT	1.0	กรัม
100 Mm $MgSO_4.7H_2O$	10.0	กรัม

MT in 1N HCl

$FeSO_4.7H_2O$	2.78	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	1.98	กรัม
$CoSO_4.7H_2O$	2.81	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	1.47	กรัม
$CuCl_2.2H_2O$	0.17	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.29	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8

3.2.2. อาหารที่ใช้เตรียม inoculum 2 ประกอบด้วย:

K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast Extract	5.0	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8

ใช้อาหารที่ใช้เตรียม inoculum 1 และ อาหารที่ใช้เตรียม inoculum 2 บรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปริมาณ 100 มล. แล้วจึงเติมน้ำมันมะกอก ให้มีความเข้มข้น 0.1 % W/V และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3. การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

3.3.1. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ประกอบด้วย:

K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast Extract	5.0	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8

นำมาละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มล. ปริมาณ 300 มล. ผสมสารประกอบทั้งหมดให้เข้ากันก่อนที่จะนำไปปรับ pH แล้วจึงเติมน้ำมันมะกอกให้มี

ความเข้มข้น 0.1% W/V และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2. การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

ถ่ายเชื้อที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1.2 แล้วปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.1 นำไปเขย่าด้วยเครื่องที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ เก็บตัวอย่างทุกๆ 30 นาที ติดตามการเจริญ แอคติวิตีของไลเปส โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ 3.5

3.4. การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อสร้างไลเปส

3.4.1. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน)

K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast Extract	5.0	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8

นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1 มาเติมน้ำมันมะกอกและเลซิตินในความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้

3.4.1.1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และ น้ำมันมะกอก 0.1 % นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.2. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และน้ำมันมะกอก 0.075 % และเลซิติน 0.025 % นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นใน moulinex นาน 10 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.3. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 3

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และน้ำมันมะกอก 0.05 % และเลซิติน 0.05 %นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นใน moulinex นาน 10 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 4

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และ น้ำมันมะกอก 0.025 % และเลซิติน 0.075 %นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นใน moulinex นาน 10 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 5

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และ เลซิติน 0.1 % นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 (มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน)

$NaNH_4HPO_4.4H_2O$	3.5	กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	7.5	กรัม
KH_2PO_4	3.7	กรัม
MT	1.0	กรัม
100 Mm $MgSO_4.7H_2O$	10.0	กรัม
MT in 1N HCl		
$FeSO_4.7H_2O$	2.78	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	1.98	กรัม
$CoSO_4.7H_2O$	2.81	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	1.47	กรัม
$CuCl_2.2H_2O$	0.17	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.29	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8

นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1 มาเติมน้ำมันมะกอกและเลซิตินในความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้

3.4.2.1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 6

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 และ น้ำมันมะกอก 0.1 % นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2.2. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 7

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 และ น้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นใน moulinex นาน 10 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2.3. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 8

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 และ น้ำมันมะกอก 0.05 %และ เลซิติน 0.05 % นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นใน moulinex นาน 10 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2.4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 9

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 และ น้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075 % นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นใน moulinex นาน 10 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2.5. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 10

ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 และ เลซิติน 0.1 % นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5. การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการทำงานของไลเปส

3.5.1. การเตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการทำงานของไลเปส

3.5.1.1. การเตรียมสับสเตรทของไลเปส

ซับสเตรทประกอบไปด้วย

1 % (W/V) gum arabic	90.0	มล.
1 M NaCl	19.0	มล.
2 % $CaCl_2$	2.1	มล.

ผสมให้เข้ากัน แล้วตวงมา 100 มล. เติมน้ำมันมะกอก 1 มล. แล้วนำไปผสมให้เข้ากันในเครื่อง mounilex ที่ความเร็วสูง 7 นาที จะได้ 1 % emulsion ของน้ำมันมะกอก ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำไปใช้

3.5.1.2. สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ pH 4.8

ชั่งโซเดียมอะซิเตท 0.5456 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 950 มล. แล้วจึงเติมกรดอะซิติค 1.38 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ 4.8

3.5.1.3. สารละลายมาตราฐาน โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มอล

ชั่งโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วจึงนำไปหาความเข้มข้นมาตราฐานโดยใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท (potassium hydrogen phthalate, $COOH.C_6H_4COOK$, analytical reagent) อบนาน 2 ชั่วโมง ที่ 121 °ซ แล้วทำให้เย็นลงในโถอบแห้ง ชั่งอย่างละเอียด 0.5105 กรัม ลงในขวดรูปรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้ม 20 นาที เขย่าจนละลายหมดแล้วจึงนำไปปรับ ให้ได้ 100 มล. ด้วย volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วใช้ไตเตรทด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มอล

ความเข้มข้นมาตราฐานของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตราฐาน (N)} = \frac{\text{กรัมของ } COOH.C_6H_4COOK \times 1000}{\text{มิลลิลิตรของ KOH} \times 204.22}$$

3.5.1.4. สารละลายฟีนอล์พทาลีน 0.433 %

ชั่งฟีนอล์พทาลีน 0.433 กรัม ละลายลงใน 95 % เอธานอล 100 มิลลิลิตร

3.5.1.5. สารอิมัลชั่นของกรดโอลีอิกมาตราฐาน

ดูดกรดโอลีอิกมาตราฐานมา 0.317 มิลลิตร ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่าง เอธานอลกับ ไดเอธิลอีเทอร์ อัตราส่วนระหว่าง 1: 1 ปริมาตร 50 มล. ที่ปรับ pH ให้เป็นกลางแล้ว ดังนั้นสารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 20 umol/ml. นำสารละลายที่ได้มาปริมาตร 1, 2, 3, 4 และ 5 มล. (20, 40, 60, 80 และ 100 umol) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. จากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่าง เอธานอล กับ ไดเอธิลอีเทอร์ อัตราส่วนระหว่าง 1: 1 ปริมาตร 50 มล. เติมฟีนอล์พทาลีน 1 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตราฐานโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 M จนกระทั่งถึงจุดยุติ (สารละลายฟีนอล์พทาลีนเปลี่ยนเป็นสีชมพู)

3.5.2. การวัดแอคติวิตีของไลเปส

นำ 1 % emulsion ของน้ำมันมะกอกมา 15 มล. และสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. มาบ่มที่ 45 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม เอธานอล 95 % ปริมาณ 20 มล. ไตเตรทกรดไขมันอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วย KOH 0.025 M โดยใช้ฟีนอล์พทาลีน เป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์

ไขมันแล้วได้กรดอิสระ 1 ไมโครโมล ภายในเวลาและสภาวะที่กำหนด และแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เป็นหน่วยต่อ มล. ของสารละลายเอนไซม์

$$\text{Unit of enzyme} = \frac{M - M_0 \times 0.5}{1.21 \times 10^{-3}}$$

โดยที่ M = mole ของ KOH ที่ถูกใช้ในปฏิกิริยาซึ่งคำนวณได้จาก ปริมาณ KOH x molar KOH

M_0 = mole ของ KOH ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ blank (นำเอนไซม์ไปนึ่งที่ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที)

1.21×10^{-3} = ความชันของกราฟมาตราฐานกรดโอเลอิก

0.5 = ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการวัดแอคติวิตี (มล.)

Total activity = Unit of enzyme x 300 ml.

โดยที่ 300 = ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

3.6. การวัดปริมาณโปรตีน

3.6.1. สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต

3.6.1.1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 M

ชั่ง โซเดียมไฮดรอกไซด์มา 240 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร โดย volumetric flask ขนาด 1 ลิตร

3.6.1.2. สารละลายไบยูเร็ต (Dumas , 1971) ประกอบไปด้วย

$CuSO_4.5H_2O$	3	กรัม
$NaKC_4H_4O_6.4H_2O$	9	กรัม
KI	5	กรัม
6 M NaOH	100	มล.

ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 3 กรัม กับน้ำกลั่น 500 มล. เติมส่วนผสมทั้งหมดข้างต้น แล้วนำมาปรับปริมาตร ให้ได้ 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask ขนาด 1 ลิตร

3.6.1.3. สารละลาย blank ประกอบด้วย

$NaKC_4H_4O_6.4H_2O$	9	กรัม
KI	5	กรัม
6 M NaOH	100	มล.

ละลายสารทั้งหมด ปรับให้ปริมาตรได้ 1 ลิตรโดยใช้ volumetric flask ขนาด 1 ลิตร

3.6.1.4. สารละลายโปรตีนมาตราฐาน (Standard Protein Solution)

ละลาย bovine serum albumin (BSA) จำนวน 10 มก. ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 10 มล. เก็บไว้ที่ –20 ^{o}ซ

3.6.2. การวัดปริมาณโปรตีน

นำสารละลายไบยูเร็ต 5 มล. และ สารละลายเอนไซม์ 0.05 มล. ผสมให้เข้ากันอย่างดี ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปเทียบกับโปรตีนมาตราฐาน BSA (ภาคผนวก)

3.7. การหาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริส

3.7.1. การเตรียมสารละลายสำหรับเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริส

3.7.1.1. สารละลายอะไครลาไมด์ (สารละลาย A) (30 % อะไครลาไมด์, 0.8 % บิส-อะไครลาไมด์)

นำอะไครลาไมด์ 29.2 กรัม และ บิส-อะไครลาไมด์ 0.8 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล. เก็บในขดสีชาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

3.7.1.2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 8.8 เข้มข้น 2 โมลาร์

ชั่งทริส-ไฮโดรคลอริก 24.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มล. ปรับ pH 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

3.7.1.3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 6.8 เข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งทริส-ไฮโดรคลอริก 12.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มล. ปรับ pH 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

3.7.1.4. สารละลาย 10 % เอสดีเอส

ละลายเอสดีเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล.

3.7.1.6. สารละลาย 1 % โบรโมฟีนอลบลู

ละลายโบรโมฟีนอลบลู 100 มก. ในน้ำกลั่น 10 มล.

3.7.1.7. สารละลายทริส-ไกลซีน อีเลคโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3

ชั่งทริส 3.0 กรัม เอสดีเอส 1.0 กรัม ไกลซีน 14.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ1 pH เป็น 8.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.7.1.8. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลาย 0.1 กรัมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ในน้ำกลั่น 1.0 มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้

3.7.1.9. สารละลายสำหรับ separating gel (สารละลาย B)

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 8.8	75	มล.
สารละลาย 10 % เอสดีเอส	4	มล.
น้ำกลั่น	21	มล.

3.7.1.10. สารละลายสำหรับ staking gel (สารละลาย C)

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 6.8	50	มล.
สารละลาย 10 % เอสดีเอส	4	มล.
น้ำกลั่น	46	มล.

3.7.1.11. สารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับตัวอย่าง (Sample buffer)

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 6.8	0.6	มล.
สารละลาย 50 % กลีเอรอล	5.0	มล.
สารละลาย 10 % เอสดีเอส	2.0	มล.
2-เมอร์แคปโตเอทธานอล	0.5	มล.
สารละลาย 1 % โบรโมฟีนอลบลู	1.0	มล.
น้ำกลั่น	0.9	มล.

3.7.1.12. น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

ละลาย Coomassie blue R-250 1 กรัม ในเมทิลแอลกอฮอล์ 450 มล. เติมกรดอะติก 100 มล. และน้ำกลั่น 450 มล.

3.7.1.13. น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

ผสมเมทิลแอลกอฮอล์ 100 มก. กับกรดอะซิติก 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร

3.7.2. การทำเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น

3.7.2.1. การเตรียมเจล (สำหรับ 2 แผ่น)

เตรียม 7.5 % separating gel โดยผสมสารละลายดังนี้

สารละลาย A	8.34	มล.
สารละลาย B	5.0	มล.
น้ำกลั่น	6.66	มล.
สารละลาย 10 % แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	100	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร

เตรียม staking gel ผสมสารละลายดังนี้

สารละลาย A	1.34	มล.
สารละลาย C	2.0	มล.
น้ำกลั่น	4.6	มล.
สารละลาย 10 % แอมโมเนียมเบ่อร์ซัลเฟต	60	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร

3.7.2.2. การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างกับสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:4 ในหลอดขนาดเล็กนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.7.2.3. การทำอิเลคโตรโฟรีซีส (แบบ Mini - PROTEAN II ; BIO-RAD)

ประกบแผ่นกระจกขนาดยาวและขนาดสั้นด้วยกันโดยมี spacer ขนาด 0.75 มิลลิเมตร คั่นกลางกระจกทั้งสองแผ่นที่ริมด้านซ้ายและด้านขวา นำกระจกใส่ sandwich clamp assembly หมุนเกลียวให้แน่นพอดี และนำไปติดตั้งไว้กับอุปกรณ์ casting stand เมื่อพร้อมแล้วจึงเติมเจลที่เตรียมไว้ในข้อ 3.6.1 หยอดใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองแผ่น ห้ามให้มีฟองอากาศ เมื่อเติมเจลจนเต็มแล้วจึงนำ comb มาเสียบลงด้านบนเพื่อให้เกิดเป็นช่องสำหรับใส่สารตัวอย่าง รอจนกระทั่งเจลแข็งตัวเจล นำ sandwich clamp assembly มาประกบกับ inner cooling core ใส่ลงใน chamber และเติม บัฟเฟอร์โดยให้บัฟเฟอร์ท่วมเส้นลวดด้านนอก และเส้น

ลวดด้านใน แล้วผ่านความต่างศักย์ 200 โวลล์ ตั้งให้เป็น constant voltage ประมาณ เวลา 45 นาที

3.7.2.4. การย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจล

แกะเจลจากแผ่นกระจกแล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีนทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยน้ำยาล้างสีโปรตีน จนกระทั่งเจลใส และได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน เก็บเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

3.8. การทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ขึ้นในบางส่วน

แยกไลเปสโดยใช้ aqueous two phase systems เตรียมสารละลายโพลีเอธิลลีนไกลคอลที่เปอร์เซ็นต์แตกต่างกัน (ตั้งแต่ 0 – 45 % w/w) และสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ (ตั้งแต่ 5 – 25 % w/w) ผสมลงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเอาเซลล์ออกไปแล้ว โดยใช้ vortex ประมาณ 30 วินาที และเหวี่ยงแยกชั้นที่ 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนบนซึ่งจะมีไลเปสอยู่ นำไปตกตะกอนด้วย อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8 และนำตะกอนที่ได้ไปปั่นล้าง 3 ครั้ง และทำการละลายตะกอนใน ทริส-บัฟเฟอร์ pH 7.8 นำสารละลายที่ได้ไปวัดแอคติวิตีไลเปสตามข้อ 3.5 และนำมาคำนวณหาค่าแอคติวิตีต่อยูนิต